

(19) JAPANESE PATENT OFFICE  
(12) PATENT JOURNAL (A)  
(11) KOKAI PATENT NO. SHO 63[1988]-92671

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: C08L 89/00  
C08H 1/00  
//A61K 7/00  
7/06

Sequence Nos. for Office Use: 6845-4J  
7019-4J  
7306-4C  
7430-4C

(21) Application No.: SHO 61[1986]-238915

(22) Application Date: October 7, 1986

(43) Publication Date: April 23, 1988

No. of Inventions: 1 (Total of 7 pages)

Examination Request: Not requested

(54) Title: PEPTIDE HAVING EXCELLENT STORAGE STABILITY AND METHOD  
FOR MAKING THE SAME

(72) Inventors: Kiyoshi Otoi  
3-3-9 Aoyamada  
Fukita, Osaka  
  
Osami Yamamoto  
700 Shiokawa  
Maruko, Chiisagata  
Nagano

(71) Applicants:

Kanebo, Ltd.  
5-17-4 Kuroda  
Kuroda-ku, Tokyo

Kanebo Kinuito Kyobijin Co., Ltd.  
637 Torimarumichishijoshitarusugincho  
Kamigyo-ku, Kyoto  
Kyoto

[There are no amendments to this patent application.]

### Claims

1. Peptide powder containing 0.10-10 wt% (based on the peptide) of a chelating agent and having an average degree of polymerization of 2-600, or its aqueous solution.

2. Powder or its aqueous solution described in Claim 1, containing 0.50-5 wt% (based on the peptide) of a chelating agent.

3. Powder or its aqueous solution described in Claim 1, wherein the peptide is a silk peptide or collagen peptide.

4. Powder or its aqueous solution described in Claim 1, wherein the chelating agent is EDTA, sodium tripolyphosphate, or sodium hexametaphosphate.

5. Powder or its aqueous solution described in Claim 1, wherein the peptide has an average degree of polymerization of 4-100.

6. A method for the manufacture of an aqueous solution of a peptide having an average degree of polymerization of 2-600 or powder thereof, characterized in that a protein aqueous solution obtained by dissolving silk fibroin or collagen in an aqueous medium is hydrolyzed or not hydrolyzed, treated with 0.10-10 wt% (based on the peptide) of a chelating agent, adjusted to pH 4.5-7.5, subjected to precision filtration with a filtration pore diameter below 1  $\mu\text{m}$ , then dried if needed.

7. The manufacturing method described in Claim 6, wherein the protein aqueous solution is a silk fibroin aqueous solution obtained by dissolving a silk raw material in an aqueous solution of calcium or magnesium chloride or nitrate.

8. The manufacturing method described in Claim 6, wherein the protein aqueous solution is a collagen aqueous solution obtained by treating natural collagen in water at pH 1.5-4.0 with an acid-resistant proteinase.

9. The manufacturing method described in Claim 6, wherein the hydrolysis is carried out with an acid, alkali, or enzyme.

\* \* \*

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭63-92671

⑪ Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和63年(1988)4月23日
C 08 L 89/00	LSE	6845-4J	
C 08 H 1/00	NDV	7019-4J	
// A 61 K 7/00		7306-4C	
7/06		7430-4C	審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 保存安定性に優れたペプチド及びその製造法

⑮ 特 願 昭61-238915

⑯ 出 願 昭61(1986)10月7日

⑰ 発 明 者	音 居 清	大阪府吹田市青山台3丁目3番9号
⑰ 発 明 者	山 本 修 身	長野県小県郡丸子町塩川700
⑰ 出 願 人	鐘 紡 株 式 会 社	東京都墨田区墨田5丁目17番4号
⑰ 出 願 人	カネボウ絹糸京美人株式会社	京都府京都市下京区烏丸通四条下水銀屋町637番地

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

保存安定性に優れたペプチド及びその製造法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) キレート化剤をペプチドに対し0.10～1.0重量%含有する平均重合度が2～600のペプチド粉末またはその水溶液。
- (2) キレート化剤をペプチドに対し0.50～5重量%含有する特許請求の範囲第1項記載の粉末またはその水溶液。
- (3) ペプチドがシルクペプチド又はコラーゲンペプチドである特許請求の範囲第1項記載の粉末または水溶液。
- (4) キレート化剤がEDTA又はトリポリリン酸ソーダ或いはヘキサメタリン酸ソーダである特許請求の範囲第1項記載の粉末または水溶液。
- (5) ペプチドの平均重合度が4～100である特許請求の範囲第1項記載の粉末または水溶液。
- (6) 絹フィブロイン又はコラーゲンを水系媒体

に溶解して得られた蛋白質水溶液を加水分解し、又は加水分解することなく、次いで該水溶液にキレート化剤をペプチドに対して0.10～1.0重量%添加し、pH 4.5～7.5に調整した後、孔径1μm以下の精密ろ過処理を実施する、そして必要により乾燥すること、を特徴とする平均重合度が2～600のペプチド水溶液またはその粉末の製造法。

- (7) 蛋白質水溶液が絹原料をカルシウム又はマグネシウムの塩酸塩或いは硝酸塩の水溶液に溶解して得た絹フィブロイン水溶液である特許請求の範囲第6項記載の製造法。
- (8) 蛋白質水溶液が、天然コラーゲンをpH = 1.5～4.0の水中に於いて、耐熱性プロテアーゼで処理して得たコラーゲン水溶液である特許請求の範囲第6項記載の製造法。
- (9) 加水分解を酸又はアルカリ或いは酵素処理で実施すること、を特徴とする特許請求の範囲第6項記載の製造法。

## 8. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、高品質でしかも保存安定性に優れた粉末状絹フィブリンペプチド及びその水溶液さらにそれ等の製造法に係り、特に化粧品基剤に好適な絹フィブリンペプチド及びその製造法に関する。

## (従来の技術)

絹フィブリン(シルク)は、その適度な吸湿性や保湿度、皮膚や毛髪に対する優れた親和性や保護作用等の特性を有しているために、従来から絹フィブリン粉末がローキャップ化粧品基剤等の用途に使用されてきた。

従来、絹フィブリンや絹フィブリンペプチド粉末として、特公昭40-24920号公報、特公昭26-4947号公報並びに特公昭58-38449号公報には、絹糸をそのまま或いは化学的处理で脆化させたものを粉碎した繊維状の絹フィブリンパウダー、絹フィブリンを適当な濃厚中性塩等に溶解透折し得られたコロイド溶液を粉砕乾燥して製造したゲル状絹フィブリンを

(基礎化粧品)基剤としては不適当である。

また絹繊維を原料とした水性化粧品基剤に関しては、絹繊維を塩酸、硫酸、リン酸等の強酸水溶液中で煮沸分解し、絹繊維の分解で生成する混合アミノ酸を主成分とする粉末を得る方法、特公昭42-17080号公報に記載の様に、絹フィブリンを高濃度リン酸で処理して得られる溶液にアセトン等の特定の有機溶媒よりなる凝固剤を混合して部分分解物を析出せしめ、再びこれを水に分散した後、蛋白分解酵素を作用させ、次いで前記凝固剤を用いて沈澱を析出させる方法が知られている。

これ等の方法のうち、前者は混合アミノ酸を主成分とするものであるため、化粧用基剤として特に有用というものではない。又、後者の場合、本質的に固液反応であるため分子量分布は広くならざるを得ず、又平均分子量を低くすればアミノ酸の生成量が必然的に増加し凝固剤で析出し難くなる等のため品質、コスト両面に問題があり、操作も煩雑である。

粉碎した粒状の絹フィブリンパウダー、並びに絹フィブリンを適当な無機中性塩或いはアルカリ性水溶液に溶解後透折し或いはしない得られたコロイド溶液から、凝固性塩の添加、空気吹込み、等電点凝固、超音波処理或いは高ずり変形速度での撹拌等で絹フィブリンを凝固析出せしめ、脱水、乾燥後粉碎した微粉末状絹フィブリンが開示されている。

しかし特公昭40-24920号公報に記載の絹フィブリンパウダーは繊維状であり、粒子も大きいため化粧品基剤として使用した場合には種々の欠点を有する。又、特公昭26-4947号公報に記載の絹フィブリンパウダーは、粉砕乾燥のため水溶性と非水溶性の絹フィブリンが混在し再凝集が起こり易く、化粧品基剤として不適当である。

いずれにしてもこれらの方法で得られた絹フィブリンパウダーは水に不溶性ないしは大部分が水に不溶性であるため、化粧料用途としてはローキャップ化粧用基剤に限られていて、水性化粧料

一方、特開昭55-124798号公報には、銅-エチレンジアミン水溶液、水酸化銅-アルカリ-グリセリン水溶液、臭化リチウム水溶液、カルシウム或いはマグネシウム又は亜鉛の塩酸塩或いは硝酸塩又はチオシアン酸塩の水溶液、チオシアン酸ナトリウム水溶液よりなる群から選ばれた少なくとも一種の溶媒に精練絹原料を溶解後透折して得た0.5~20重量%の絹フィブリン水溶液を酵素或いは酸又はアルカリにより加水分解することとを特徴とする絹フィブリンペプチドの製造法が提案されている。

該方法の場合、溶媒が穏やかなものであるため絹フィブリンの化粧料用基剤として有用な蛋白質構造を損傷することが無く、又透折を

$$\frac{\text{膜表面積 (cm}^2\text{)}}{\text{ブライミング容量 (cm}^3\text{)}} \geq 1.0$$

を満足する多層膜構造物又は中空糸束構造物を使用して実施し、又加水分解が液-液反応で均一に行なわれるため、得られた絹フィブリンペプチドは分子量分布の巾が狭く、その平均分子量の調

整が容易である等、水性化粧品用として高品質で有用なペプチド基剤である。

特開昭56-40695号公報及び特願昭60-22577では、前記溶解-透析法で得られた高品質のペプチド水溶液を、いずれも特殊な条件で乾燥することを特徴とする再溶解性に優れ、熱劣化のない粉末状絹フィブリンペプチドの製造法が提案されている。

又、コラーゲンを原料とするペプチドも水溶液や粉末の形で市販されている(商品名「プロモイス」、「ニッピペプタイド」等)。

ところで、これ等のペプチドの長期保存の品質安定性はやや不十分であって、種々の問題点や使用上の制約がある。例えば数ヶ月間の保存で褐褐色に変色したり、濁りが生じたり、著しい場合はゲル状物が大量に沈殿する。

この対策としては、ペプチドを冷暗所に保存したり、製造後短期間に消費したり、製品への配合量を少量に限定したりしているので実情であって、根本的な解決策は未だ見出されていない。

600のペプチド水溶液またはその粉末の製造法によって達成される。

本発明のキレート化剤の添加効果は、特に絹フィブリンペプチドの場合顕著である。

本発明のペプチドの平均重合度は2~600、好ましくは4~100、特に好ましくは6~40である。平均重合度が2未満ではアミノ酸含有量が增加して、例えば化粧品用原料として使用する場合、ペプチド特有の皮膚に対する保湿、調湿作用が損なわれ、更に水性化粧品基剤として使用する場合に皮膚形成性に欠ける。一方、平均重合度が600(平均分子量 $\approx 50,000$ )を上超えると、水系での溶解安定性が低下し、キレート化剤を混合しても濁りやゲル状物が発生する。

本発明に適用する蛋白質水溶液としては各種蛋白質を原料とすることができるが、特に絹フィブリン、コラーゲンを原料として、公知である通常の方法で調製した水溶液が好ましい。

本発明に使用する絹フィブリン原料は、まゆ、生糸、まゆ屑、生糸屑、ビス、揚げ綿、絹布屑、

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者等は、各種ペプチドの製品性状や品質の改良について鋭意研究した結果、本発明を完成したものである。本発明の目的は、適度な吸湿性や保湿性、皮膚や毛髪に対する優れた親和性や保護作用等の特性を持ち、しかも長期間の保存安定性に優れたペプチドを提供するにある。他の目的は、斯るペプチドを工業的に容易且つ安価に製造する方法を提供するにある。

(問題点を解決するための手段)

上述の目的は、キレート化剤をペプチドに対し0.10~10重量%含有する平均重合度が2~600のペプチド粉末またはその水溶液、並びに絹フィブリン又はコラーゲンを水系媒体に溶解して得られた蛋白質水溶液を加水分解し、又は加水分解することなく、次いで該水溶液にキレート化剤をペプチドに対して0.10~10重量%添加し、pH4.5~7.5に調製した後、濾過孔径1 $\mu$ m以下の精密濾過処理を実施する、そして必要により乾燥することを特徴とする平均重合度が2~

ブレット等を常法に従い必要に応じて活性剤の存在下、温水中で又は酵素の存在下温水中でセリンを除去し乾燥したものを使用する。

本発明に適用する絹フィブリンの溶媒は、銅-エチレンジアミン水溶液、水酸化銅-アンモニア水溶液(シュワイサー試薬)、水酸化銅-アルカリグリセリン水溶液(ローエ試薬)、臭化リチウム水溶液、カルシウム或いはマグネシウム又は亜鉛の塩酸塩或いは硝酸塩又はチオシアン酸塩の水溶液、チオシアン酸ナトリウム水溶液が挙げられるが、コスト及び使用上の点からカルシウム又はマグネシウムの塩酸塩又は硝酸塩が好ましい。又、これ等の水溶液の濃度は使用する溶媒の種類、温度等により異なるが、金属塩等の濃度は通常10~80重量%、好ましくは20~40重量%である。80重量%以上でも溶解するが、生成するペプチドに実質的な差異が無く経済性の点で問題である。

精製後の絹原料を前記水溶液よりなる溶媒に添加し、温度60~95℃、好ましくは70~85

℃でニーダの如き装置内で均一に溶解するが、液比は通常2～50、好ましくは3～30である。

得られた糊フィブロイン溶解液から高純度の糊フィブロインペプチドを得るためには、引続いて透析する。透析はセロファン膜に代表される透析膜や中空纖維を使用した透析器を用い、前記の塩類等をほぼ完全に除去する。この場合目的とする糊フィブロインペプチドの分子量分布を極力狭くするためと、 $\alpha$ 構造のペプチドの割合を50重量%以上に調整するためには、透析量と透析膜面積を特定する必要がある。即ち下記式を満足する多層膜構造物又は中空糸集束構造物を使用して脱塩を行なう。

$$\frac{\text{膜表面積 (cm}^2\text{)}}{\text{ブライミング容量 (cm}^3\text{)}} \geq 10$$

(ここで、ブライミング容量とは透析チューブ又は膜間の内容積を示す)

上記数値が10未満の場合、膜分離が迅速に行なわれないため透析器中での滞留時間が長くなり、得られるフィブロイン水溶液は、既に腐敗が始ま

っていることが多い。その場合、フィブロイン蛋白は腐敗による変性で水不溶( $\beta$ 構造)化し、これを再び冷水易溶性化することは困難である。

特に本発明を円滑に且つ経済的に行うために、上記数値は80以上が好ましく、50以上が特に好ましい。該条件を満足させるためには、例えば中空糸集束構造物の場合中空糸の直径を4mm以下にする必要がある。

本発明方法に於いて得られた透析液は、残留塩濃度が0.008～0.06重量%と極めて少なく、特に中空糸の径が0.2mm程度になると、

$$\frac{\text{膜表面積 (cm}^2\text{)}}{\text{ブライミング容量 (cm}^3\text{)}} \geq 200$$

となり透析器中での滞留時間数10分で、これを達成することができ、これより極めて高品質の糊フィブロインペプチドを得ることができる。

本発明に適用するコラーゲン、特にアテロコラーゲンは、例えば若い牛の皮を細砕後、水に分散させ、pH=1.5～4.0に調整後、これに耐酸性プロテアーゼ(例ペプシン)を加え、2～8日間

攪拌を続け、不溶物を濾過で除き蛋白質水溶液とする。

本発明に於て蛋白質濃度は本質的なものではないが、通常0.5～40重量%、好ましくは1～80重量%、更に好ましくは2～20重量%で、必要に応じて濃縮される。0.5重量%以下では後工程で濃縮の必要があり不経済であるし、40重量%以上では粘性が高くなって反応や操作に無理がある。

ペプチドの平均分子量が数百～数千のものを得ようとする場合、これを酵素或いは酸又はアルカリを用いて加水分解を行なう。

本発明に適用される加水分解酵素としては通常の前蛋白質分解酵素、例えば放線菌から得られるプロナーゼ、ババイヤから得られるプロラーゼ等の数種のプロテアーゼ混合物と考えられる酵素群、アスペルギルス・ニゲル等のカビから得られるプロテアーゼやバチルス・ズブチリス等の細菌から得られるプロテアーゼ例えばズブチリシンB、P、N或いはトリブシン、キモトリブシン、ババイン、

プロメルリン等が挙げられ、これらを単独或いは2種以上混合して使用することができる。使用する酵素の量は酵素の種類、純度、反応条件、或いは目的とする糊フィブロインの平均重合度等により異なるが、通常糊フィブロインに対して0.01～1.00重量%、好ましくは0.02～5.0重量%である。この場合の加水分解の条件は使用する酵素の種類、濃度等により異なるが、通常pHは5～9、好ましくは6～8.5、温度は20～70℃、好ましくは30～45℃で0.1～72時間、好ましくは0.5～12時間行う。

加水分解に用いる酸としては塩酸、硫酸等の無機酸又はくえん酸、酒石酸、マロン酸、こはく酸及びマレイン酸等の有機酸が挙げられる。またアルカリとしては水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、アンモニア水等の無機アルカリ、メチルアミン等の有機アルカリが使用し得るが、反応性、経済性、安定性の面から、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムが好ましい。

酸又はアルカリによる加水分解の条件は使用す

る酸又はアルカリの種類、目的とするペプチドの平均重合度及び重合度分布等により異なるが、通常0.08～8.0N、好ましくは0.8N以下の濃度で、温度は20～110℃、好ましくは30～100℃で、0.5～48時間、好ましくは1～24時間反応を行い、その後アルカリ又は酸を加えて中和する。

本発明に於いて、ペプチドに長期間の保存安定性を付与するため、キレート化剤をペプチドに対して0.10～1.0重量%、好ましくは0.5～5重量%添加する。添加する時期は加水分解終了後又は中和した後が好ましい。さらにキレート化剤の添加後、50℃以上に数時間以上加熱した方がより好ましい結果が得られる。0.10重量%未満では、室温で数ヶ月保存したペプチド水溶液や再溶解した粉末ペプチドの水溶液に色相の褐変や濁りが認められる。一方、10%を越える添加は保存安定性に有意差が無く経済的でないし、又ペプチドの純度がそれだけ低くなり好ましくない。

本発明のキレート化剤は、通常のキレート化剤

きる。

さらに本発明で得られたペプチドは、水溶液からの皮膜形成能が良く、吸湿性、保湿性が良好であり、さらに皮膚に対する親和性や保護作用等に優れた特性を持っており、化粧品用基剤、医薬品カプセル剤、分析用基剤、その他に有用である。

#### (実施例)

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。なお、実施例中の測定及び測定結果の算出は次の方法で行なった。

#### a. ペプチド平均重合度の測定

ペプチドを完全加水分解した場合のアミノ酸モル数を求め、これを(a)とする。ペプチドの末端基量を測定しこれを(b)とする。平均重合度=(a)/(b)として求める。(a)を得るには(1)乾燥固形分率より灰分率を差引き、これとペプチド構成アミノ酸の平均分子重より求める。(2)ケルゲール窒素測定より求めた窒素原子数をアミノ酸モル数とする。(3)水酸化ナトリウム又は塩酸加水分解後、生成アミノ酸をニンヒドリン比色定量する等の方法に依る。

がペプチドの用途で問題がなければすべて適用できるが、経済性の点でEDTA又はトリポリ磷酸ソーダ或いはヘキサメタ磷酸ソーダが望ましい。

EDTAはpHとの関係で2Na塩又は3Na塩がより望ましい。

本発明方法に於いては、得られたペプチド水溶液を、引き続き凍結乾燥法やスプレードライ法により乾燥することもできる。この場合、乾燥は通常の凍結乾燥機やスプレードライ材により実施し得るが、水溶液中のペプチド濃度が40%を上廻る場合、得られた乾燥物の水に対する溶解度、溶解速度が極めて低くなり、例えば水性化粧品用基剤として実用的でない。

#### (発明の効果)

以上の如く、本発明の方法により得られたペプチドは、その添加されたキレート化剤の効果で、水溶液の場合、長期間液の着色や濁り或いはゲル状物の発生を抑えた状態で保存でき、又粉末の場合はペプチドの変性を防いで、水に対する溶解度及び溶解速度を低下させないで保存することがで

各測定法に若干の違いがあるが、一般に良い一致を示す。(b)はフォルモール測定法により末端 $-CO_2H$ 基を測定すれば良い。

#### b. 光透過度の測定

日立557型二波長分光光度計を用い、420mμでの光透過度を測定した。測定試料はペプチド濃度5%に調整し、セル長は10mmである。

#### 実施例1

絹フィブロイン原料として絹紡織屑を用いて、これの100部をマルセル石けん30部、水3000部の溶液で95～98℃において8時間攪拌精練し、残糖を0.1%以下にまで減少させ、水洗後80℃で熱風乾燥した。

塩化カルシウム( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )100部に水100部を混合して38重量%塩化カルシウム水溶液200部を調製して110℃に加熱した。これに精練済みの絹紡屑40部をニーダを用いて5分間で攪拌しながら投入後、さらに30分間攪拌し完全に溶解させた。

次に、内径200μ、膜厚20μ、長さ500



mm の再生セルロース系中空糸を2000本束ね、この両端を中空穴を開閉することなく集束固定（シール）したホローファイバー型の透析装置を用いて、前記溶解液を0.2ℓ/時間の割合で流入させて脱イオン水を用いて透析し、フィブリン水溶液を得た。該フィブリン水溶液のフィブリン濃度は1.8重量%で、残留塩化カルシウムは0.001重量%であった。

得られたフィブリン水溶液に、ナガセ生化学工業社製ビオブラゼ・コンクを細フィブリン固形分に対して0.5重量%添加し20℃から70℃に昇温しながら4時間反応させた。反応を終了させるために15分間沸とうし、冷却後、これに第1表に示した濃度でEDTA・2Na塩を添加し0.6μの孔径のメンブラン濾過後密封下に室温で保存した。ペプチド平均重合度の測定の結果、本発明例の平均重合度は12.5であった。1ヶ月、この着色度と濁りの程度を分光光度計及び肉眼で測定した。着色度は420mμでの光の透過度で測定した。その結果をEDTA添加直後の透過度

と併せて第1表に示す。

第 1 表

テストNo.	EDTAの添加量(重量%・対ペプチド)	保存前の透過度(%)	保存1ヶ月後の透過度(%)	濁りの程度
比較例1	0	63	4	ゲル状物沈降・白濁
〃 2	0.005	〃	11	やや白濁
本発明例1	0.10	〃	38	殆んど透明
〃 2	0.50	〃	55	透 明
〃 3	1.0	〃	〃	〃
〃 4	5.0	〃	〃	〃
〃 5	10.0	62	57	〃
比較例3	20.0	〃	58	〃

以上のように、キレート化剤の添加量は0.10重量%で実用的には効果が認められ、0.50重量%以上ではペプチド水溶液の劣化は殆んど認められない。又、10重量%以上の添加は効果の割に経済的でない。

## 実施例2

実施例1で得た透析液を、第2表に示す塩酸濃

度で5時間95℃に加熱し、攪拌して加水分解した後、5N-NaOH水溶液で中和した。次いでEDTA・3Na塩を8%重量（対ペプチド重量）添加し、0.6μの孔径のメンブラン濾過後、密封下室温で保存した。1ヶ月後の着色度、濁りの程度を実施例1に準じて第2表に示す。

第 2 表

テストNo.	塩酸濃度(N)	ペプチドの平均重合度	保存前の透過度(%)	保存1ヶ月後の透過度(%)	濁りの程度
比較例4	120	1	38	15	透明・褐色
本発明例6	0.70	2	46	30	透明
〃 7	0.33	4	54	48	〃
〃 8	0.26	6	60	50	〃
〃 9	0.16	25	68	60	〃
〃 10	0.12	42	75	66	〃
〃 11	0.09	98	62	55	〃
〃 12	0.07	280	42	34	殆んど透明
〃 13	0.05	580	40	32	〃
比較例5	0.04	660	40	8	白濁

註) 平均重合度100以上の数字は測定方法の

## 限界でやや不正確

上表から判るように、420mμでの透過度の変化は本発明例に於いては軽微であって、キレート化剤の保存安定作用が平均重合度600程度まで実用的に効果的である。平均重合度660での透過度の劣化は濁りのためであって、暗く着色したためではない。

## 実施例3

幼牛の皮の毛及び肉組織を除去し、細碎し、水にて充分洗浄した。該不溶性コラーゲン100部を水1000部に懸濁させ、これに0.2部のペプシン（耐酸性蛋白分解酵素）を混合し、希塩酸にてpH=2~8に調整し攪拌を続けた。該酵素反応を72時間続けると不溶性コラーゲンは、テロペプチドとアテロコラーゲンの結合が分解され水に溶解した。次いで、溶解液を濾過し、未溶解物を濾別したのち、溶解液を希水酸化ナトリウム液でpH=7~8に調整しアテロコラーゲンのみを沈澱させた。これを分離し、1000部の水に混合後、希塩酸にてpH8に調整し攪拌すること

で5.6重量%のアテロコラーゲン水溶液を製造した。これを塩酸0.15N、95℃×8時間の条件で加水分解した後、5N-NaOH水溶液で中和した。次いでこれにEDTA・2Na塩を添加した後、0.45μの孔径でメンブラン濾過し、密封保存した。ペプチド平均重合度を測定したところ、本発明例の平均重合度は18.0であった。

結果を実施例1に準じて第8表に示す。

第 3 表

テストNo.	EDTAの添加量(重量%・対ペプチド)	保存前の透過度(%)	保存1ヶ月後の透過度(%)	着色の程度(肉眼)
比較例 6	0	57	26	淡褐色
" 7	0.005	"	30	やや褐色
本発明例 14	0.10	"	52	変化なし
" 15	0.50	"	53	"
" 16	1.0	"	"	"
" 17	5.0	"	"	"
" 18	10.0	"	"	"
" 19	20.0	55	"	"

以上のように、コラーゲンペプチドの場合も、

第 4 表

テストNo.	試料	保存前の透過度(%)	保存1ヶ月後の透過度(%)	着色の程度(肉眼)
本発明例 20	a	57	55	変化なし
" 21	b	"	56	変化なし
比較例 8	c	"	38	やや褐色

重合リン酸ソーダ系のキレート化剤のペプチド保存効果も顕著であり、その効果は粉末状で保存する場合も有効であることが分る。

出 願 人 綿 紡 株 式 会 社  
" カネボウ絹糸京美人株式会社



キレート化剤の添加はシルクペプチドの場合とほとんど同様の効果が認められ、効果と経済性の総合評価としては0.50～5.0重量%の添加が最も好ましい。

#### 実施例 4

実施例 8 で得たコラーゲンペプチドに

- トリポリ燐酸ソーダを2.5重量%(対ペプチド)添加した。
- ヘキサメタ燐酸ソーダを5.0重量%(対ペプチド)添加した。
- キレート化剤を添加しない。

以上8種の水溶液を0.45μ孔径でメンブラン濾過し、この水溶液を-80℃に急冷し凍結せしめた。これを乾燥初期は0.5 torr、終了時点では0.05 torr程度の通常の凍結乾燥法で乾燥し、粉末状のコラーゲンペプチドを製造し、密封下室で保存した。保存1ヶ月後、これを水に再溶解し5.0%の水溶液とし、この着色度を実施例3に準じて測定した。その結果を第4表に示す。